EXPRESIÓN DE GENES CODIFICANTES PARA PROTEÍNA, ABUNDANTES EN EMBRIOGÉNESIS TARDÍA (LEA), DURANTE EL OSMOACONDICIONAMIENTO DE SEMILLAS DE MAÍZ Y FRIJOL

EXPRESSION OF LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT (LEA) PROTEIN CODIFYING GENES DURING OSMOPRIMING OF MAIZE AND BEAN SEEDS

Francisco **Campos-Álvarez**[1*], Felipe **Cruz-García**[2*], Alma **Torres-Espinosa**[2], Marypaz **Sánchez-Jiménez**[2], José M. **Colmenero-Flores**[1], Claudia **Smith-Espinoza**[1], Alejandra A. **Covarrubias-Robles**[1] y Jorge M. **Vázquez-Ramos**[2]

[1]Departamento de Biología Molecular de Plantas. Instituto de Biotecnología. UNAM. Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250 y [2]Departamento de Bioquímica, Facultad de Química. UNAM. Av. Universidad y Copilco, México 04510, D.F., México. (jorman@servidor.unam.mx)
*Ambos autores contribuyeron igualmente en este trabajo.

RESUMEN

El osmoacondicionamiento (OSMA) bloquea la germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.) y de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y las semillas pueden permanecer en este estado por más de dos semanas sin que emerja la raíz. Aparentemente, bajo estas condiciones el proceso germinativo de las semillas se detiene en una etapa temprana. Los genes tipo *lea* (late embryogenesis abundant) o de expresión abundante durante la embriogénesis tardía se expresan tanto durante la embriogénesis tardía como en respuesta a condiciones de déficit hídrico. Con la finalidad de conocer su comportamiento durante OSMA, se determinó los patrones de acumulación de su transcrito y, en algunos casos, de la proteína correspondiente, de diferentes genes tipo *lea*, o bien, genes codificantes para proteínas de choque térmico (PvLEA 4-25, PvLEA 18, Pvhsp 17.19, Zmhsp 17.4 y de dehidrina) en semillas de una variedad de frijol y otra de maíz, osmoacondicionadas. Se encontró una respuesta contrastante de las semillas a la condición de OSMA: los respectivos transcritos en semillas de frijol desaparecieron durante el período de siete días de OSMA, una respuesta semejante a como ocurriría durante la germinación. Por otro lado, los transcritos en semillas de maíz se acumularon hacia el final del período de 10 días de OSMA, mostrando una conducta semejante a una respuesta de estrés. Se discute sobre el posible significado de esta respuesta diferencial entre maíz y frijol al OSMA.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris*, *Zea mays*, genes *lea*, genes *shsp*.

INTRODUCCIÓN

La pérdida de vigor durante el almacenamiento de semillas provoca una reducción en la germinabilidad y en el establecimiento en campo de la plántula. Se han desarrollado varias metodologías para revigorizar semillas y una de éstas es la de osmoacondicionamiento (OSMA), que consiste en

Recibido: Enero, 2001. Aprobado: Junio, 2002.
Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 36: 461-470. 2002.

ABSTRACT

Osmopriming maize (*Zea mays* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds blocks germination and seeds can remain in this stage more than two weeks without root emergence. Apparently, under these conditions, seed germination seems to be halted at an early stage. As part of the characterization of the osmopriming process of bean and maize seeds, we have studied the transcript accumulation patterns of genes encoding proteins, which are abundant during late embryogenesis and responsive to water deficit conditions. This study includes some of the so called *lea* genes (PvLEA4-25, PvLEA18, rab17) and those corresponding to a particular gene family encoding small heat shock proteins (Pvhsp17.19, Zmshsp17.4). In some cases the accumulation patterns of the corresponding proteins were also obtained. Results show a contrasting response of seeds to the osmoprimed condition: transcripts in bean seeds disappear during the 7 days osmopriming period, a response similar to that of a germination. On the contrary, transcripts in maize seeds accumulated by the end of the 10 days osmopriming period, with a response similar to that of a stress response. The possible meaning of this contrasting response between maize and bean is discussed.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, *Zea mays*, *lea* genes, *hsp* genes.

INTRODUCTION

Loss of vigor during seed storage causes a reduction in germinability and seedling establishment. Several methodologies have been developed to re-invigorate seeds and one of these is osmopriming, which consists of pre-imbibing seeds in a solution containing an inert osmotic agent such as poly-ethylene glycol (PEG), which reduces water availability. Cells in seeds can reactivate metabolism but germination (i.e. radicle protrusion) will not ensue. The beneficial effect of osmopriming is manifested as a fast and uniform germination after PEG removal (Heydecker and Coolbear, 1977; Bradford, 1986).

pre-imbibir semillas en una solución que contiene un agente osmótico inerte como lo es el polietilén glicol (PEG), el cual reduce la disponibilidad de agua. Las células en las semillas pueden reactivar su metabolismo, pero el proceso germinativo, definido como el brotamiento radicular, no ocurre. El efecto benéfico del OSMA se manifiesta en forma de una germinación rápida y uniforme después de la remoción del PEG (Heydecker y Coolbear, 1977; Bradford, 1986).

Las condiciones para osmoacondicionar semillas varían de acuerdo con la especie vegetal que corresponda. El maíz (*Zea mays* L.), una semilla monocotiledónea, requiere un potencial osmótico de −1.7 MPa (de hecho, en un rango de −1.7 a −2.0 MPa se logra un OSMA estable; Cruz- García *et al*., 1995), mientras que una semilla dicotiledónea como el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) requiere un potencial osmótico cercano a −1.0 MPa; un potencial más negativo reduce considerablemente la viabilidad de las semillas de frijol (Sánchez Jiménez *et al*., 1997). Bajo condiciones apropiadas, las semillas de maíz y frijol pueden permanecer en la solución osmótica inerte hasta por dos semanas sin pérdida aparente de los beneficios adquiridos durante el OSMA.

Las semillas se encuentran en un estado metabólicamente activo en condiciones de OSMA. La síntesis de proteínas y ARN se detecta unas pocas horas después de la imbibición en PEG y esta síntesis puede continuar por varios días (Bray *et al*., 1989; Davison y Bray, 1991; Dell'Aquila y Spada, 1992; Cruz-García *et al*., 1995). Un bajo nivel de síntesis de ADN también se detecta y éste se ha considerado como de tipo reparativo u organelar (Coolbear y Grierson, 1979; Ashraf y Bray, 1993; Cruz-García *et al*., 1995). Adicionalmente, existe evidencia de duplicación del ADN en semillas de diferentes especies (Bino *et al*., 1992; Lanteri *et al*., 1993). La germinación post-OSMA de semillas de poro (*Allium porrum* L.) , maíz y frijol causa una rápida activación de la duplicación del ADN y de la división celular y esto ocurre horas antes de cuando sucede durante la germinación no estimulada de este tipo de semillas (Ashraf y Bray, 1993; Cruz-García *et al*., 1995; Sánchez- Jiménez *et al*., 1997).

Durante los procesos de desarrollo y maduración, cuando ocurre la desecación natural, las semillas acumulan transcritos y proteínas en una concentración relativamente alta; por esta razón, las proteínas encontradas fueron denominadas "Abundantes en Embriogénesis Tardía" (Late Embriogenesis Abundant o LEA) y a los genes correspondientes, genes *lea* (Bewley y Black, 1994). Estas proteínas no sólo se acumulan durante la última etapa en la formación de la semilla (Galau *et al*., 1986; Baker *et al*., 1988; Bray, 1993), sino que también se encuentran en tejidos vegetativos en respuesta a la deshidratación y,

Conditions for osmopriming seeds vary according to the type of plant species. Maize (*Zea mays* L.), a monocotiledoneous seed, requires an osmotic potential of −1.7 MPa (stable osmopriming can be achieved in the range of −1.7 to −2.0 MPa; Cruz García *et al*., 1995), while dicotiledoneous seeds as common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) require an osmotic potential close to −1.0 MPa, since a more negative osmotic potential importantly reduces bean seeds viability (Sánchez Jiménez *et al*., 1997). Under the appropriate conditions, maize and bean seeds can remain in the inert osmotic solution for at least two weeks without any apparent loss of the benefits acquired by osmopriming.

During osmopriming seeds are in a metabolically active stage. Protein and RNA synthesis can be detected within a few hours after imbibition in the PEG solution and this synthesis may continue for several days (Bray *et al*., 1989; Davison and Bray, 1991; Dell'Aquila and Spada, 1992; Cruz García *et al*., 1995). A low level DNA synthesis can also be detected during osmopriming and this has been regarded as of organellar or repair type (Coolbear and Grierson, 1979; Ashraf and Bray, 1993; Cruz García *et al*., 1995). Besides, evidence of some replicative DNA synthesis has also been reported (Bino *et al*., 1992; Lanteri *et al*., 1993) in different seeds. In leak, maize an common beans germination, post-osmopriming rapidly triggers DNA replication and cell division and this occurs hours before this takes place under non-stimulated germination conditions (Ashraf and Bray, 1993; Cruz García *et al*., 1995; Sánchez Jiménez *et al*., 1997).

During development and maturation, when natural desiccation takes place, seeds accumulate transcripts and proteins at a relatively high concentration; for this reason, when first found, proteins were named Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins (Bewley and Black, 1994). These proteins not only accumulate during the last stage of seed formation (Galau *et al*., 1986; Baker *et al*., 1988; Bray, 1993), but also in vegetative tissues in response to dehydration or upon exogenous application of abscisic acid (ABA) (Galau *et al*, 1986; Mundy and Chua, 1988; Harada *et al*., 1989; Ingram and Bartels, 1996; Close, 1997). Lea proteins have been grouped into at least six families on the basis of sequence similarity (Ingram and Bartels, 1996; Colmenero-Flores *et al*., 1997). Although significant similarity has not been detected among members of the different classes, an unifying and outstanding feature of these proteins is their high hydrophilicity and high percentage of glycine residues (Baker *et al*., 1988; Dure, 1993). Lea protein families have been identified in a wide range of plant species, to the extent that they can be considered ubiquitous throughout the plant kingdom (Ingram and Bartels, 1996; Close, 1997). Although a precise function

en algunos casos, en respuesta a la aplicación de ácido abscísico (Galau *et al*., 1986; Mundy y Chua, 1988; Harada *et al*., 1989; Ingram y Bartels, 1996; Close, 1997). Las proteínas LEA se han agrupado en al menos seis familias sobre la base de la similitud en secuencias (Ingram y Bartels, 1996; Colmenero-Flores *et al*., 1997). Aunque no se ha detectado una similitud significativa entre los miembros de las diferentes familias, una característica unificadora y sobresaliente de estas proteínas es su alta hidrofilicidad y su alto porcentaje de residuos de glicina (Baker *et al*., 1988; Dure, 1993). Las proteínas LEA se han identificado en un amplio rango de especies vegetales, al grado que se han considerado ubicuas en el Reino Vegetal (Ingram y Bartels, 1996; Close, 1997). Aunque no se ha demostrado una función precisa para ninguna de las proteínas LEA, evidencia circunstancial e indirecta apuntaría a que estas proteínas cumplen una función como protectoras de estructuras y proteínas celulares durante lapsos de estrés por sequía o congelamiento (Ingram y Bartels, 1996; Xu *et al*., 1996; Imai *et al*., 1995; Close, 1997; Swire-Clark y Marcotte, 1999).

Las semillas secas almacenan una considerable cantidad de proteínas LEA y de sus respectivos mensajes, la mayoría de los cuales son degradados durante la germinación, lo que muy probablemente provee a la semilla de precursores que serán usados para sintetizar la nueva información y las estructuras necesarias para el proceso de desarrollo siguiente, la formación de una plántula (Bewley y Black, 1994).

Dado que las semillas osmoacondicionadas son metabólicamente activas, pero no germinan, es necesario conocer los mecanismos involucrados en este proceso. Puesto que los transcritos y proteínas de genes tipo *lea* generalmente se acumulan durante la fase tardía del desarrollo de la semilla y se degradan al inicio del proceso germinativo, como un acercamiento a la caracterización del mismo, en este trabajo se determinó los patrones de acumulación de los transcritos y de las proteínas de diferentes genes tipo *lea* en semillas de dos especies durante el osmoacondicionamiento, una monocotiledónea y una dicotiledónea. Como hipótesis se plantea que si el OSMA representa un estado de germinación incipiente, se tendrá que ver la gradual degradación de las proteínas LEA con el paso del tiempo de OSMA; por el contrario, si durante el OSMA las semillas no han encendido el proceso germinativo, las proteínas LEA serán estables.

MATERIALES Y MÉTODOS

Semillas

Se usaron semillas de la variedad Chalqueño de maíz y semillas de frijol, variedad Negro Jamapa. Las semillas mostraron una viabilidad de 90 a 95% después de la imbibición.

has not been demonstrated for any Lea protein, circumstantial and indirect evidence indicates that they play a role as protectors of cellular structures and proteins during drought and freezing stress (Ingram and Bartels, 1996; Xu *et al*., 1996; Imai *et al*., 1995; Close, 1997; Swire-Clark and Marcotte, 1999).

Dry seeds contain a considerable store of Lea proteins and their messages, most of which are degraded during germination, very likely providing the seeds of precursors that will be used to build the new information and structures necessary for the following developmental process (Bewley and Black, 1994).

Since osmoprimed seeds are metabolically active, but do not germinate, it is important to know the mechanisms involved in this process. As *lea*-type transcripts and proteins generally accumulate during late seed development and are degraded in the early germination stages, the experimental approach taken to characterize osmopriming consisted in determining the patterns of transcript and protein accumulation of different *lea*-type genes in two seeds species, a monocotiledoneous and a dicotiledoneous. The hypothesis is that if osmopriming represents an early germination stage, there will be a gradual Lea transcripts degradation with osmopriming time. On the contrary, if during osmopriming the germination process is not triggered, Lea transcrips will be stable.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Seeds from maize (*Zea mays* L.) cv. Chalqueño and common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Negro Jamapa were used. They showed 90-95% germination after imbibition.

Chemicals

Polyethylene glycol 8000 (PEG) and Tris (tris hydroxymethyl amino methane) were from Sigma-Aldrich Chemicals Co., Hybond-N membranes, enhanced chemiluminescence (ECL) kit and [^{32}P] dCTP (3000 Ci/mmol) were from Amersham International; Random Primer kit was from Gibco, BRL. Protease inhibitor cocktail was from Boehringer. All other reagents were of analytical grade.

cDNA probes

Complementary DNA (cDNA) probes from common beans were: group-4 Lea cDNA (*Pvlea*4-25), group-6 Lea (*Pvlea*18) and class I heat shock protein cDNA (*Pvhsp*17-19). All encode for transcripts and proteins highly accumulated during late embryogenesis in bean seeds (Colmenero-Flores *et al*., 1997). Probes for maize seeds were: a partial cDNA clone coding for a class I heat shock protein (Zmhsp 17.4, Shen *et al*., 1996) and a cDNA coding for a group 2 Lea protein (also called dehydrins) (rab 17; Goday *et al*., 1994).

Sustancias químicas

El polietilén glicol 8000 y el Tris (tris hidroximetil amino metano) se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemicals Co.; las membranas Hybond-N, el kit para quimioluminiscencia (ECL) y el [^{32}P]-dCTP (3000 Ci/mmol) se adquirieron de Amersham International; el kit para marcaje por Random Primer se adquirió de Gibco, BRL. La mezcla de inhibidores de proteasas se adquirió de Boehringer. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Sondas de ADNc

Las sondas de ADN complementario (ADNc) correspondientes a genes de frijol son: ADNc codificante para una LEA del grupo 4 (PvLEA 4-25), ADNc codificante para una LEA del grupo 6 (PvLEA 18) y ADNc codificante para una proteína de choque térmico de clase I (Pvhsp 17.19). Estos ADNc codifican para transcritos y proteínas que se acumulan abundantemente durante la embriogénesis tardía en frijol (Colmenero-Flores *et al*., 1997). Para maíz se usaron: una clona parcial de ADNc codificante para una proteína de choque térmico de clase I (Zmhsp 17.4, Shen *et al*., 1996) y un ADNc codificante para proteínas LEA del grupo 2 (también llamadas dehidrinas) (rab 17; Goday *et al*., 1994).

Osmoacondicionamiento de semillas

El osmoacondicionamiento se realizó según lo describen Cruz-García *et al*. (1995) y Sánchez-Jiménez *et al*. (1997). En forma breve, las semillas fueron desinfectadas lavándolas con agua destilada estéril y sumergiéndolas en una solución de Captán a 0.25% por 10 minutos. El exceso de agua se eliminó al frotar las semillas contra papel Whatman estéril; posteriormente las semillas se colocaron en una incubadora a 30 °C por una hora. Luego, las semillas de maíz o frijol (25 semillas en cada caso, por duplicado) se pusieron en cajas de Petri que contenían dos discos de papel Whatman No. 1 estéril y 40 mL de la solución de PEG a −2.0 MPa para maíz, o a −1.0 MPa para semillas de frijol. La incubación de las semillas fue a 25 °C por los períodos indicados en la sección de Resultados.

Medición del potencial de agua

El potencial de agua se determinó siguiendo los métodos de punto de rocío y psicrométricos descritos en el manual de instrucciones para el Dew Point Microvoltimeter HR-33T (Wescor), usando un psicrómetro de suelo (modelo PST 55-15).

Extracción de ARN y análisis por "Northern Blot"

El ARN total se preparó al tratar el material vegetal pulverizado por congelación por el método del fenol caliente, siguiendo el procedimiento reportado por De Vries *et al*. (1991). El ARN fue extraído de: embriones secos (frijol) o de ejes embrionarios secos (maíz); de embriones de semillas osmoacondicionadas por 1, 3 y 7 días (frijol); de ejes embrionarios de semillas osmoacondicionadas por 3, 5 y 10

Seed Osmopriming

Seed osmopriming was performed as described before (Cruz García *et al*., 1995; Sánchez Jiménez *et al*., 1997). Briefly, maize or bean seeds were disinfected by rinsing with sterile water and then soaking in a 0.25% Captan solution for 10 min. Excess water was removed by blotting the seeds with sterile Whatman paper, which were then maintained in the cabinet at 30 °C for 1 h. Then, maize or bean seeds (25 seeds each in duplicate) were put into Petri dishes containing two discs of Sterile Whatman No. 1 paper and 40 ml of PEG solution at -2.0 MPa for maize seeds or −1.0 MPa for bean seeds. Incubation of seeds was at 25 °C for the periods of time indicated in Results.

Water potential measurements

Water potential was determined following the dew point and psychrometric methods as described in the instruction manual for the HR-33T Dew Point Microvoltimeter (Wescor) using a soil psychometer (model PST 55-15).

Extraction of RNA and northern blot analysis

Total RNA was prepared from the frozen powdered material by the hot-phenol method, following the procedure of De Vries *et al*. (1991). RNA was extracted from: dry seed embryos (beans) or dry embryo axes (maize), from 1, 3 and 7 days osmoprimed bean embryos or 3, 5 and 10 days osmoprimed maize embryo axes, and from 5, 10 and 24 h germinated bean embryos or maize embryo axes after osmopriming. RNA (30 μg/sample) was electrophoresed through a 1% formaldehyde-agarose gel and then blotted on to Hybond-N membranes (Sambrook *et al*., 1988). Probes used for hybridization were labeled using a Random Primer kit and [α-^{32}P] dCTP (30 μCi). Pre-hybridization and hybridization solutions (at a temperature range between 58-65 °C, depending on the probe used) contained 0.3 M sodium phosphate pH 7.2, 7% SDS and 1 mM EDTA. The filter was washed twice at 55 °C with 2X SSC (0.3 M NaCl, 30 mM sodium citrate, pH 7.0), 0.1% SDS and once with 0.2 x SSC, 0.1% SDS for 15 min each. Filters were exposed to Kodak XAR films at −80 °C using an intensifying screen.

Extraction of proteins and western blot analysis

Embryos (beans) or embryo axes (maize) were homogenized at 4 °C in extraction buffer (70 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM $MgCl_2$, 25 mM KCl, 0.25 mM sucrose, 15 mM b-mercaptoethanol, 0.1% Triton X-100, 5 mM EDTA and protease inhibitor cocktail). Extracts were centrifuged 30 min at 150,000 x g at 4 °C and protein was determined by the method of Bradford (1976).

Proteins were extracted from dry maize embryo axes or dry bean seed embryos and from 7 days osmoprimed bean embryos or 3 and 10 days osmoprimed maize embryo axes, and from 5, 10 and 24 h germinated bean embryos or maize embryo axes after osmopriming. Proteins were separated by SDS-PAGE, the gels were washed with transference buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM glycine and 20%

días (maíz) y de embriones o ejes embrionarios germinados por 5, 10 y 24 horas después del OSMA. El ARN (30 μg/muestra) se separó por electroforesis a través de geles de agarosa-formaldehido 1% y entonces fue transferido a membranas Hybond-N (Sambrook *et al*., 1988). Las sondas de ADNc a usarse en la hibridación se marcaron usando el kit para marcaje al azar (Random Primer) y [α-^{32}P] dCTP (30 μCi). Las soluciones de pre-hibridación y de hibridación (en un rango de temperatura de 58 a 65 °C dependiendo de la sonda a usarse) contenían fosfato de sodio 0.3M, pH 7.2, SDS a 7% y EDTA 1 mM. La membrana se lavó dos veces a 55 °C con SSC 2X (NaCl 0.3M, citrato de sodio 30 mM, pH 7.0), SDS a 0.1% y una vez con SSC 0.2 X, SDS a 0.1% por 15 minutos cada uno. Las membranas se expusieron a película Kodak XAR a −80 °C usando una pantalla intensificadora de la señal.

Extracción de proteínas y análisis por inmunodetección ("Western blot")

Los embriones de frijol o los ejes embrionarios de maíz se homogeneizaron a 4 °C en amortiguador de extracción (Tris-HCl 70 mM pH 7.5, $MgCl_2$ 1 mM, KCl 25 mM, sacarosa 0.25 mM, β-mercaptoetanol 15 mM, Tritón X-100 0.1%, EDTA 5 mM y mezcla de inhibidores de proteasas). Los extractos celulares se centrifugaron 30 minutos a 150 000 X g a 4 °C y se determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford (1976).

Las proteínas se extrajeron de embriones o ejes embrionarios secos de frijol y maíz, respectivamente; de embriones de semillas de frijol osmoacondicionadas por siete días; de ejes embrionarios de semillas de maíz osmoacondicionadas por tres y diez días y de embriones o ejes embrionarios de semillas germinadas por 5, 10 ó 24 horas post-OSMA. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de acrilamida-SDS, los geles se lavaron con buffer de transferencia (Tris-HCl 20 mM, glicina 150 mM y metanol a 20%) y las proteínas se transfirieron a filtros PVDF (con poro de 0.2 mm) mediante un aparato Transblot LKB por 90 minutos a una corriente de 1 mA/cm^2. Para esto se usó el sistema de amortiguador semi-discontinuo recomendado por los proveedores. Para la inmunodetección se usaron los anticuerpos contra la proteína PvLEA18 (Colmenero-Flores *et al*., 1997) y contra la proteína Rab 17 (donado por M. Pagés; Goday *et al*., 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una de las características del osmoacondicionamiento de semillas es que la disponibilidad de agua se mantiene en un nivel sub-óptimo, de tal forma que el proceso germinativo se inicia pero es detenido en alguna etapa. Una germinación completa, definida como brotamiento radicular, nunca ocurre.

El potencial osmótico de las semillas de frijol y maíz se midió tanto durante el OSMA como durante la germinación subsiguiente. La Figura 1 muestra que el potencial osmótico en las semillas de maíz alcanzó valores de −2.0 MPa durante el OSMA. Las semillas de frijol

methanol) and proteins were transferred to PVDF filters (0.2 mm pore size) by means of a LKB Transblot apparatus for 1.5 h at 1 mA cm^{-2}. The semi-discontinuous buffer system recommended by the manufacturers was used. Antibodies against the PvLEA 18 protein (Colmenero- Flores *et al*., 1999) and against the Rab 17 protein (kindly provided M. Pagés, Goday *et al*., 1994) were used.

RESULTS AND DISCUSION

One of the characteristics of seed osmopriming is that water availability is maintained at a suboptimal level so that the germination process initiates but it is halted at some point. A complete germination, taken as radicle protrusion, never takes place.

The osmotic potential of maize and bean seeds was measured during both osmopriming and germination post-osmopriming. Figure 1 shows that the osmotic potential in maize seeds was −2.0 MPa during osmopriming. Bean seeds had values around −1.2 MPa all along the osmopriming process. These values were further increased in both types of seeds as they germinated. Osmotic potential values in bean seeds were initially higher than those in maize seeds during osmopriming, implying that bean seeds can be osmoprimed with a higher water content. However, both types of seeds showed very similar post-osmopriming germination rates and metabolic activity regardless of the differences in water content during osmopriming (Cruz García *et al*., 1995; Sánchez Jiménez *et al*., 1997).

Lea protein transcripts accumulate during late seed development, when the desiccation period is established and their levels decrease during seed germination. Many *lea* genes are also expressed under water deficit conditions (Colmenero-Flores *et al*., 1999). To understand response of *lea* genes during osmopriming, the transcript accumulation pattern of genes *Pvlea* 18, *Pvlea* 4-25 and *Pvhsp* 17.19 from bean seeds and of genes *rab* 17 and *Zmhsp* 17.4 from maize seeds was analyzed.

As expected, the transcripts for the three bean genes were present in dry seeds. However, in all cases transcript accumulation levels decreased during osmopriming, although with different rates. The *Pvhsp* 17-19 transcript (Figure 2) slowly declined to very low levels by 7 day osmopriming and only traces were detected by 24 h germination post-osmopriming. Reduction in the levels of the *Pvlea* 4-25 transcript was faster during osmopriming and it was no longer detected by 24h germination post-osmopriming (Figure 2). In the case of *Pvlea* 18 transcript, this was not detected by 3 days osmopriming, nor during germination post-osmopriming (Figure 2).

These results suggest that the PEG treatment stops germination since it imposes a water deficit. However, on the other hand, the PEG treatment to dry seeds provides

alcanzaron valores de −1.2 MPa durante el OSMA. Estos valores se incrementaron en ambas especies de semillas según germinaron. Los valores del potencial osmótico en frijol fueron inicialmente mayores que los de maíz durante OSMA, lo que implica que frijol puede ser osmoacondicionado con un mayor contenido de agua. No obstante, ambas especies de semillas mostraron tasas de germinación y actividad metabólica muy semejantes después del OSMA, independientemente de las diferencias en el contenido de agua durante el OSMA (Cruz-García *et al*., 1995; Sánchez-Jiménez *et al*., 1997).

Los transcritos de las proteínas LEA se acumulan, durante el estado tardío del desarrollo de las semillas, cuando se inicia el periodo de desecación, en tanto que sus niveles disminuyen durante el proceso de germinación. Por otro lado, la expresión de muchos genes LEA se induce durante situaciones de déficit hídrico (Colmenero-Flores *et al*., 1999). Con la finalidad de conocer la respuesta de estos genes durante el proceso de OSMA, se hizo un análisis de los patrones de acumulación de los transcritos correspondientes a los genes de frijol *Pvlea* 18, *Pvlea* 4-25 y *Pvhsp* 17.19 y de maíz *rab* 17 y *Zmhsp* 17.4. Como se esperaba, los transcritos para los tres genes de frijol estuvieron presentes en la semilla seca. Sin embargo, en todos los casos los niveles de los transcritos descendieron durante el OSMA, aunque con velocidades diferentes. El transcrito del gen *Pvhsp* 17.19 (Figura 2) declinó lentamente hasta alcanzar niveles muy bajos hacia los siete días de OSMA y sólo se detectaron trazas del transcrito a las 24 horas de germinación post-OSMA. La reducción de los niveles del transcrito del gen *Pvlea* 4-25 fue más rápida durante el OSMA y no se pudo detectar el transcrito a las 24 horas de germinación post-OSMA (Figura 2). En el caso del transcrito para el gen *Pvlea* 18, éste no se detectó desde los tres días de OSMA, ni durante la germinación post-OSMA (Figura 2).

Lo anterior sugiere que el tratamiento con PEG es capaz de detener la germinación ya que, en efecto, impone una situación de déficit hídrico para este proceso. Sin embargo, por otro lado, el tratamiento de las semillas secas con PEG resulta en proporcionar una cantidad limitada de agua, lo cual se refleja en un incremento en el potencial hídrico de la semilla tratada y, por tanto, en una disminución en los niveles de los transcritos para los genes *lea* analizados.

Una conducta contrastante se observó en la expresión de genes *lea* en semillas de maíz ya que, en semilla seca, se detectaron altos niveles del transcrito del gen *rab* 17 (dehidrina) y, hacia los tres días de OSMA, se observó una disminución de los niveles del mensaje (Figura 3). Sin embargo, hacia los cinco días de OSMA, se detectó una elevación en los niveles del transcrito por arriba de su nivel en la semilla seca. Este nivel se mantuvo constante hasta los diez días de OSMA. Durante la

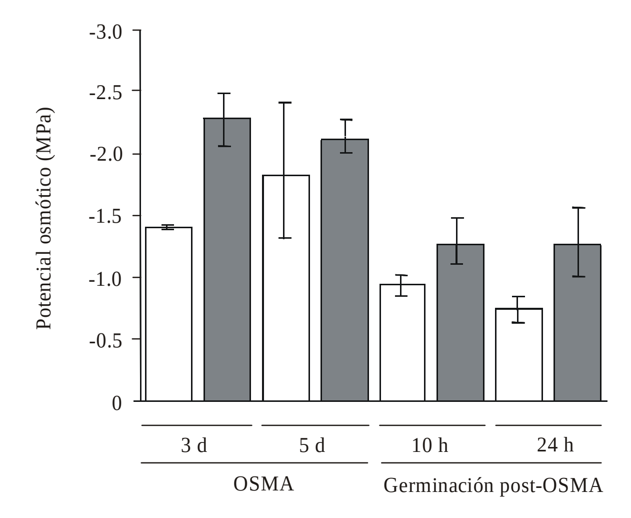
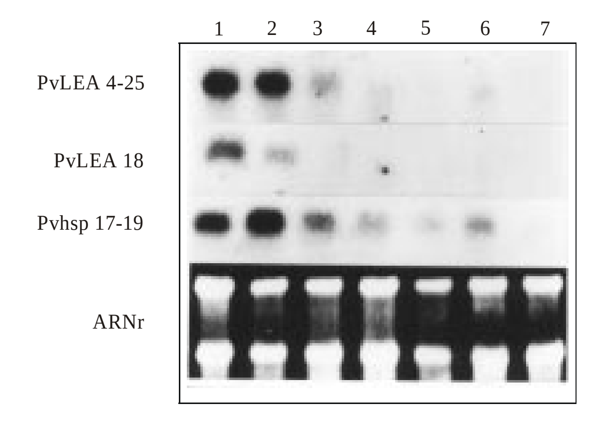


Figura 1. Potencial osmótico de las semillas de maíz y de frijol durante el OSMA y la germinación post-OSMA. Las semillas se colocaron en una solución de PEG a −2.0 MPa (maíz, barras oscuras) o a −1.0 MPa (frijol, barras claras). El potencial de agua se determinó siguiendo los métodos de punto de rocío y psicrométricos usando un psicrómetro de suelo. OSMA, tratamiento de osmoacondicionamiento; post-OSMA, germinación después del OSMA. La barra representa la desviación standard, n=3.

Figure 1. Osmotic potential of bean and maize seeds during osmopriming and germination post-osmopriming. Seeds were placed in a PEG solution of −2.0 MPa (maize, dark bars) or −1.0 MPa (beans, empty bars). Water potential was determined following the dew point and psychrometric methods using a soil psychometer. Osma, osmopriming treatment; post-osma, germination after osmopriming. Standard deviation, n=3.

of a limited amount of water that causes an increase in the water potential of seeds and thus a decrease in the transcript levels of the *lea* genes analyzed.

A contrasting behavior was observed for the expression of *lea* genes in maize seeds. The dehydrin transcript (*gen rab* 17) was highly accumulated in dry seeds and, by three days osmopriming, messenger levels decreased (figure 3). However, by 5 days osmopriming transcript levels rose above those seen in dry seeds and remained around those levels until 10 days osmopriming. During germination post-osmopriming, the transcript levels were maintained for at least 5 hours and then declined precipitously (figure 3). Although for *Zmhsp* 17.4 higher transcript levels (as compared to *rab* 17 levels) were detected, a similar accumulation pattern was observed: present in dry seeds, the levels of transcript gradually rose to reach a maximum by 10 days osmopriming (Figure 3). Even though no reduction in its amount was observed by 3 days osmopriming as was the case of the dehydrin message, during germination post-osmopriming the amount of the transcript progressively decreased until 24 h germination.



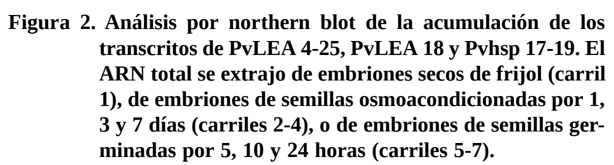


Figura 2. Análisis por northern blot de la acumulación de los transcritos de PvLEA 4-25, PvLEA 18 y Pvhsp 17-19. El ARN total se extrajo de embriones secos de frijol (carril 1), de embriones de semillas osmoacondicionadas por 1, 3 y 7 días (carriles 2-4), o de embriones de semillas germinadas por 5, 10 y 24 horas (carriles 5-7).

Figure 2. Analysis by northern blot of transcripts accumulation patterns of Pvhsp 17-19, PvLEA 4-25 and PvLEA 18 genes. Total RNA was extracted from dry embryos (lane 1), from embryos of bean seeds osmoprimed for 1, 3 and 7 days (lanes 2-4), or from embryos of seeds germinated for 5, 15 and 24 h (lanes 5-7).

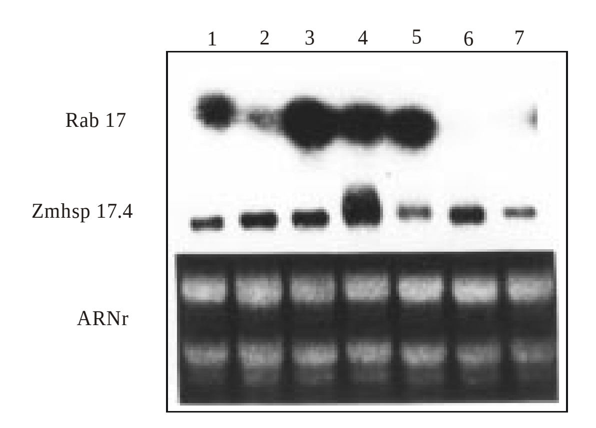


Figura 3. Análisis por northern blot de la acumulación de los transcritos de rab 17 (dehidrina) y de Zmhsp17.4. El ARN total se extrajo de ejes embrionarios secos de maíz (carril 1), de ejes embrionarios de semillas osmoacondicionadas por 3 y 5 y 10 días (carriles 2-4), o de ejes embrionarios de semillas germinadas por 5, 10 y 24 horas (carriles 5-7).

Figure 3. Analysis by northern blot of transcripts accumulation patterns of dehydrin rab 17 and Zmhsp 17.4 genes. Total RNA was extracted from dry embryo axes (lane 1), from embryo axes of maize seeds osmoprimed for 3, 5 and 10 days (lanes 2-4), or from embryo axes of seeds germinated for 5, 15 and 24 h (lanes 5-7).

germinación post-OSMA, el nivel del transcrito se mantuvo por al menos 5 horas y, posteriormente, se redujo en forma precipitada (Figura 3). Aunque los niveles detectados para el transcrito del gene *Zmhsp* 17.4 fueron mayores a los niveles de *rab* 17, el patrón de acumulación observado fue similar: presente en la semilla seca, los niveles del transcrito se incrementaron gradualmente hasta alcanzar un máximo hacia los 10 días de OSMA (Figura 3). A pesar de que no se observó la reducción a los tres días de OSMA detectada para el transcrito del gen *rab* 17, durante la germinación post-OSMA la cantidad del transcrito disminuyó progresivamente hasta las 24 horas de germinación.

Contrario a lo que sucede en frijol, las semillas de maíz, con un contenido de agua menor, acumulan los transcritos durante el OSMA. De hecho, las semillas parecen transitar entre dos estados moleculares durante el OSMA: en los primeros días del tratamiento los transcritos se estabilizan o son parcialmente degradados, quizás como consecuencia de una señal producida por un proceso germinativo que ha comenzado. Sin embargo, al prolongarse las condiciones de OSMA, cambia la señal a una de estrés que indica que las condiciones para la germinación no se establecieron después de todo y entonces las semillas responden re-acumulando los transcritos.

Para determinar si las variaciones a nivel transcripcional encontradas entre maíz y frijol también influencian el siguiente nivel de expresión, esto es, a nivel de traducción, se determinaron los niveles de las

Opposite to the situation observed in bean seeds, maize seeds, with a lower water content, accumulate transcripts during osmopriming. In fact, maize seeds seem to transit between two molecular stages during osmopriming: during the first days of treatment, transcripts are stable or they are partially degraded, perhaps the consequence of a signal produced by a germination process that has started. However, prolonging the priming conditions changes the signal to a “stress alarm” indicating that germination conditions were not established after all and seeds respond accumulating these products.

To determine whether the variations found in transcripts levels between bean and maize seeds also influenced the next expression level, that is, at the level of translation, level of the proteins codified by some of these genes was determined. An antibody against PvLEA 18 protein from beans and an antibody against maize Rab 17 protein were used. The anti-PvLEA 18 antibody identified a protein of 14 kDa in dry seeds (figure 4a, lane 1); the amount of Pvlea 18 was strongly reduced by 7 days osmopriming (lane 2) and the protein disappeared by 24 h germination post-osmopriming (lane 5). The antibody against maize Rab 17, as expected, recognized two polypeptides of around 20 and 26 kDa (Vilardell *et al.*, 1990) in dry seeds (figure 4b, lane 1). The amount of the 20 kDa protein decreased at 3 days osmopriming (lane 2) and then recovered by 10 days osmopriming (lane 3), to disappear by 24 h germination post-osmopriming (lane

proteínas codificadas por algunos de estos genes. Se usaron anticuerpos contra la proteína PvLEA 18 de frijol y contra la proteína Rab 17 de maíz. El anticuerpo anti-PvLEA 18 identificó una proteína de 18 kDa en semilla seca de frijol (Figura 4a, carril 1); la cantidad de PvLEA 18 se redujo significativamente a los siete días de OSMA (carril 2) y la proteína desapareció hacia las 24 horas de germinación post-OSMA (carril 5). El anticuerpo contra la proteína Rab 17 de maíz, como se esperaba, detectó dos bandas de 20 y 26 kDa (Vilardell *et al*., 1990) en semilla seca (Figura 4b, carril 1). La cantidad de la proteína de 20 kDa decreció a los 3 días de OSMA (carril 2) y se recuperó hacia los 10 días de OSMA (carril 3), para desaparecer hacia las 24 horas de germinación (carril 6). Una conducta semejante se observa para la proteína de 26 kDa.

Estos resultados indican que los niveles de las proteínas codificadas por los genes utilizados en este estudio se correlacionan con los niveles de acumulación de los transcritos respectivos, lo cual sugiere que durante este proceso los niveles de estas proteínas se modulan principalmente a nivel transcripcional. Explicaciones al comportamiento diferencial entre estas dos especies de semillas pudieran ser una diferente sensibilidad a situaciones similares de disponibilidad de agua, o bien que el déficit hídrico que se alcanza en los tejidos de la semilla no es comparable entre ambas semillas dada la diferencia en la composición de los tejidos que las conforman. Adicionalmente, es posible que los genes que se utilizaron en este estudio sean diferencialmente sensibles en frijol y maíz, de tal manera que las semillas de frijol pudieran estar detectando la condición de estrés a través de otros mecanismos que derivan en la detención de la germinación, pero que no involucran la inducción de la expresión de los genes en cuestión. En el caso de frijol, cabe mencionar que la condición de déficit hídrico con la cual se logra el OSMA es casi extrema, ya que las semillas de frijol no pueden ser osmoacondicionadas a valores menores de –1.2 MPa pues empiezan a perder la viabilidad y mueren (Sánchez-Jiménez *et al*., 1997).

La regulación de los genes de la embriogénesis tardía es compleja ya que responden a una condición de desarrollo que coincide con cambios en el *status* hídrico celular, el que a su vez se correlaciona con cambios en los niveles hormonales celulares. De esta manera, los promotores de estos genes podrían imponer patrones de regulación transcripcional complejos.

Se podría argumentar que la conducta de las semillas de maíz se debe simplemente a un potencial osmótico más negativo durante el OSMA, que dispara una respuesta de estrés en las células. No obstante, las semillas deberían sentir este estrés desde el primer día de OSMA y no es sino hasta después de varios días en OSMA que la respuesta molecular al estrés se establece. De esta manera,

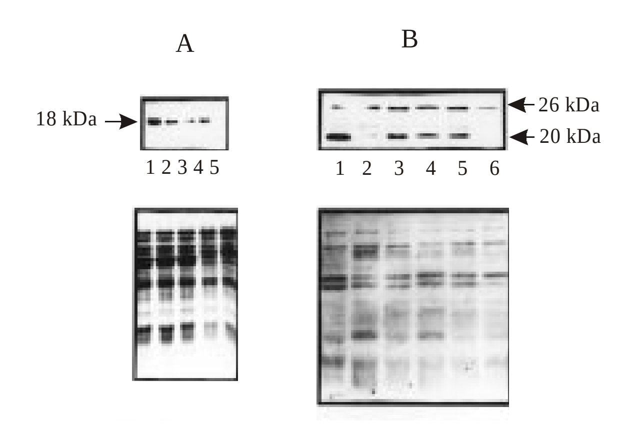


Figura 4. Análisis por western blot de las proteínas PvLEA 18 y Rab 17. A) proteínas totales de embriones secos de frijol (carril 1), de embriones después de 7 días de OSMA (carril 2) o después de 5 (carril 3), 10 (carril 4) y 24 horas (carril 5) de germinación post-OSMA. B) proteínas totales de ejes embrionarios secos de maíz (carril 1), de ejes embrionarios después de 3 (carril 2) y de 10 días (carril 3) de OSMA, o bien de 5 (carril 4), 10 (carril 5) y 24 horas (carril 6) de germinación después de OSMA.

Figure 4. Analysis by western blot of the accumulation patterns of Pvlea 18 and Rab 17 proteins. A) Total proteins isolated from dry seed embryos (lane 1) and 7 days osmoprimed (lane 2) or 5 (lane 3), 10 (lane 4) and 24 h (lane 5) germination after osmopriming, bean seed embryos. B) Total proteins from dry seed embryo axes (lane 1), 3 (lane 2) and 10 days (lane 3) osmoprimed or 5 (lane 4), 10 (lane 5) and 24 h (lane 6) germination after osmopriming, maize seed embryo axes.

6). A similar behavior was observed for the 26 kDa protein.

These results indicate that the levels of the proteins codified by the genes used in this work correlate with the accumulation levels of the corresponding transcripts, suggesting that modulation of protein levels during osmopriming mostly occurs at the level of transcription. Explanations to the differential behavior between these two seed species could be: a different sensitivity to water availability, or a difference in the water deficit reached in tissues of both seed species due to a different biochemical composition. Furthermore, it may be that the genes used in this study respond differently in maize and bean seeds, so that bean seeds could be detecting the stress condition through mechanisms deriving from detention of germination that do not involve the expression of the genes measured here. It should be stressed that for beans, the water deficit conditions by which the osmopriming is established is almost extreme, since beans cannot be osmoprimed at values below –1.2 MPa without causing loss of viability and death (Sánchez-Jiménez et al., 1997).

The regulation of late embryogenesis genes is complex since they respond to a developmental condition that

los resultados no se pueden explicar solamente como una respuesta al estrés. La respuesta podría residir en la complejidad de los procesos regulatorios que controlan la expresión génica durante la embriogénesis tardía en semillas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Por tanto, sería sumamente importante validar la generalidad de la propuesta, esto es, si el fenómeno se aplica a especies diferentes de semillas mono y dicotiledóneas.

Conclusiones

Las semillas de maíz (variedad Chalqueño) y frijol (variedad Negro Jamapa) presentan condiciones de OSMA diferentes, dado que en frijol el proceso germinativo es inhibido habiendo un mayor contenido de agua. Esta diferencia se hace visible también en la forma en que ambas especies interpretan el déficit de agua cuando se mide la expresión de genes de embriogénesis tardía durante el OSMA. Los embriones de las semillas de frijol degradan gradualmente los transcritos de los genes *lea* durante el OSMA, de manera semejante a como lo harían durante la germinación. Por otro lado, los ejes embrionarios de semillas de maíz, al principio, promueven la degradación de los mensajes de los genes *lea*, pero posteriormente revierten la señal y permiten su acumulación, semejando un estado pre-germinativo. Esta conducta probablemente no sea un simple reflejo de la percepción de un estado de estrés, sino que puede estar influenciada por el estado metabólico diferencial que representa el OSMA para las semillas de frijol y de maíz.

Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por el proyecto DGAPA-PAPIIT IN-209895.

Literatura Citada

Ashraf, M., and C.M. Bray. 1993. DNA synthesis in osmoprimed leek (*Allium porrum L.*) seeds and evidence for repair and replication. Seed Sci. Res. 3: 15-23.

Baker, J., C. Steele, and L. Dure III. 1988. Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. Plant Mol. Biol. 11: 277-291.

Bewley, J. D., and M. Black. 1994. Seeds: Physiology of Development and Germination. (2nd ed.) New York, Plenum Press.

Bino, R. J., J. M. De Vries, H. L. Kraak, and J. G. Van Pijlen. 1992. Flow cytometric determination of nuclear replication stages in tomato seeds during priming and germination. Ann. Bot. 69: 231-236.

Bradford, K. J. 1986. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. HortScience 59: 672-676.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Bray, C. M., P. A. Davison, M. Ashraf, and R.M. Taylor. 1989.

coincides with changes in the water status of cells, which in turn correlates with changes in hormonal levels. Thus promoters in these genes could impose complex transcriptional regulation patterns.

It could be argued that the behavior of maize seeds is simply due to the more negative osmotic potential required for osmopriming, that triggers a stress response in cells. Nonetheless, seeds should sense this stress state since the first day of osmopriming and it is not until after several days of osmopriming that the molecular response to stress is established. Thus, results cannot solely be explained by a stress effect. The answer may reside in the complexity of the regulatory processes that control gene expression during late embryogenesis between monocot and dicot seeds. It would be very important to validate the generality of this proposal, that is, if this phenomenon applies equally well to different mono and dicotiledoneous seed species.

Conclusions

Seeds of maize (Chalqueño variety) and beans (Negro Jamapa variety) show different osmopriming conditions, since in beans the germination process is inhibited even though their seeds contain a higher water content than maize seeds. This difference is also noticeable in the way both seed species interpret water deficit when the expression of late embryogenesis genes is measured. In bean embryos, transcripts of *lea* genes are gradually degraded during osmopriming, similarly as they are degraded during germination. On the contrary, maize embryo axes initially promote degradation of the transcripts of *lea* genes, but as the osmopriming condition is prolonged, the degradation signal is reverted, allowing transcript accumulation, resembling a pre-germinative state. This behavior may not simply be the perception of a stress state, and rather may be influenced by the differential metabolic state that osmopriming represents for maize and bean seeds.

—End of the English version—

Biochemical changes during osmopriming of leek seeds. Ann. Bot. 63: 185-193.

Bray, E.A. 1993. Molecular responses to water deficit. Plant Physiol. 103: 1035-1040.

Close, T. 1997. Dehydrins: a commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature. Physiol. Planta. 100: 291-296.

Colmenero-Flores, J.M., F. Campos, A. Garciarrubio, and A.A. Covarrubias. 1997. Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. Plant Mol. Biol. 35: 393-405.

Colmenero-Flores, J.M., L.P. Moreno, C.E. Smith, and A.A. Covarrubias. 1999. *Pvlea*-18, a member of a new Late-Embryogenesis Abundant protein family that accumulates during

water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. Plant Physiol. 120: 93-103.

Coolbear, P., and D. Grierson. 1979. Studies on the changes in the major nucleic acid components of tomato seeds (*Lycopersicon esculentum*) Mill resulting from osmotic presowing treatment. J. Exp. Bot. 30: 1153-1162.

Cruz-García, F., L.F. Jiménez and J.M. Vázquez-Ramos. 1995. Biochemical and cytological studies on osmoprimed maize seeds. Seed Sci. Res. 5: 15-23.

Davison, P. A., and C.M. Bray. 1991. Protein synthesis during osmopriming of leek (*Allium porrum* L.) seeds. Seed Sci. Res. 1: 29-35.

De Vries, S., H. Hoge, and T. Bisseling. 1991. Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues. *In*: Gelvin, S. B., Schilperoort, R. A., and Verma, D.P.S. (eds.). Plant Molecular Biology Manual 86: 1-13, Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands.

Dell'Aquila, A., and P. Spada. 1992. Regulation of protein synthesis in germinating wheat embryos under polyethylene glycol and salt stress. Seed Sci. Res. 2: 75-80.

Dure III, L. 1993. Structural motifs in LEA proteins. *In*: Close, T. J., and E. A. Bray, (eds). Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress. Am. Soc. Plant Physiol., Rockville, MD. pp: 91-103.

Galau, G.A., D.W. Hughes, and L. Dure III. 1986. Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis abundant (LEA) mRNAs. Plant Mol. Biol. 7: 155-170.

Goday, A., A.B. Jensen, F.A. Culianez-Macia, M.M. Alba, M. Figueras, J. Serratosa, M. Torrent, and M. Pagés. 1994. The maize abscisic acid-responsive protein rab 17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. Plant Cell 6: 351-360.

Harada, J., A. De Lisle, C. Baden, and M. Crouch. 1989. Unusual sequence of an abscisic acid-inducible mRNA wich accumulates late in *Brassica napus* development. Plant Mol. Biol. 12: 395-401.

Heydecker, W., and P. Coolbear. 1977. Seed treatments for improved performance survey and attempted prognosis. Seed Sci. Technol. 5: 353-425.

Imai, R., L. Chang, A. Ohta, E.A. Bray, and M. Takagi. 1995. A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Sacharomyces cerevisiae*. Gene 170: 243-248.

Ingram, J., and D. Bartels. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47: 377-403.

Lanteri, S., H.L. Kraak, C.H. Ric de Vos, and R.J. Bino. 1993. Effects of osmotic preconditioning on nuclear replication activity in seeds of pepper (*Capsicum annuum*). Physiol. Planta. 89: 433-440.

Mundy, J. and N-H. Chua. 1988. Abscisic acid and water stress induce the expression of a novel rice gene. EMBO J. 7: 2279-2286.

Sambrook, J., E.F Fritsch, and T. Maniatis. 1988m . Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sánchez-Jiménez M. P., F. Cruz García, A. Covarrubias-Robles y J. M. Vázquez Ramos. 1997. Osmoacondicionamiento de semillas de frijol: establecimiento y caracterizacion. Agrociencia 31: 305-311.

Shen, Q., P. Zhang, and T-HD Ho. 1996. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA-induction of gene expression in barley. Plant Cell 8: 1107-1119.

Swire-Clark, G. A., and R.W. Marcotte. 1999. The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Sacharomyces cerevisiae*. Plant Mol. Biol. 39: 117-128.

Vilardell, J., A. Goday, M. A. Freire, M. Torrent, M. C. Martínez, J. M. Torné, and M. Pagés. 1990. Gene sequence, developmental expression and protein phosphorylation of Rab 17 in maize. Plant Mol. Biol. 14: 423-432.

Xu, D., X. Duan, B.M. Wang, B. Hong, D.T.-H. Ho, and R. Wu. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. Plant Physiol. 110: 249-257.